

Asia I 型口蹄疫病毒中和表位与羊 IgG 重链恒定区的融合表达及免疫原性测定

王景锋, 邵军军, 李菁, 高闪电, 独军政, 丛国正, 林彤, 常惠芸

中国农业科学院兰州兽医研究所 家畜疫病病原生物学国家重点实验室 国家口蹄疫参考实验室 农业部畜禽病毒学重点开放实验室, 兰州 730046

摘要: VP1 蛋白是口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV) 诱导机体产生抗病毒感染免疫的主要蛋白, 含有病毒的若干中和表位。本研究设计和合成了由 Asia I 型 FMDV VP1 蛋白 136~160aa 和 198~211aa 两个表位组成的重复串联表位的编码基因, 并克隆了羊 IgG 重链恒定区编码基因。利用 *Bam*H I、*Eco*R I 和 *Xho* I 位点将 2 个基因片段依次克隆到 pPROExHTb 载体, 构建成重组质粒 pPRO-FshIgG, 将其转化大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞, 以 IPTG 诱导表达得到融合蛋白 FshIgG。100 μ g FshIgG 蛋白免疫豚鼠后刺激豚鼠产生了高效价的 FMDV 中和抗体, 而且使这些免疫豚鼠在用 200 ID₅₀ 剂量 FMDV 攻击时得到了完全保护。由此证明, 羊 IgG 重链恒定区蛋白能够作为 FMDV 表位肽的载体, 而融合蛋白 FshIgG 可成为一种口蹄疫表位疫苗候选物用于口蹄疫的预防。

关键词: 口蹄疫病毒, 抗原表位, 羊 IgG 重链恒定区

Fusion expression of Asia I type FMDV neutralizing epitope with heavy chain constant region of sheep IgG and the assessment of its immunogenicity

Jingfeng Wang, Junjun Shao, Jing Li, Shandian Gao, Junzheng Du, Guozheng Cong, Tong Lin, and Huiyun Chang

State Key Laboratory of Etiological Biology, National Foot-and-Mouth Disease Reference Laboratory, Key Laboratory of Animal Virology of Ministry of Agriculture, Lanzhou Veterinary Institute, China Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730046, China

Abstract: VP1 is a major antigenic protein of foot-and-mouth disease virus(FMDV), which induces the immune response against FMDV infection, and contains several epitopes of the virus. we designed and chemically synthesized a DNA fragment which encoding a tandem repeat protein of 136-160aa and 198-211aa of a strain of type Asia I FMDV, and cloned the gene of heavy chain constant region of sheep IgG. By using the *Bam*H I, *Eco*R I and *Xho* I sites, both genes were cloned into pPROExHTb vector in turn to form a recombinant plasmid pPRO-FshIgG. A chimeric protein, named FshIgG, was obtained after transforming the pPRO-FshIgG into *Escherichia coli* BL21 (DE3) host cell and induced by IPTG. Inoculation with 100 μ g FshIgG induced strong neutralizing

Received: November 9, 2009; **Accepted:** February 26, 2010

Supported by: National High Technology Reasearch and Development Program of China (863 Program) (No. 2006AA10A204), National Science and Technology Pillar Program (No. 2006BAD06A17).

Corresponding author: Huiyun Chang. Tel: +86-931-8342706; E-mail: changhuiyun@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2006AA10A204), 国家科技支持计划项目 (No. 2006BAD06A17) 资助。

antibody response in guinea pigs, and FshIgG inoculated guinea pigs were also protected against 200 ID₅₀ FMDV challenge. Our study indicated that the heavy chain constant region of sheep IgG can act as the carrier protein for FMDV peptide epitopes, and FshIgG is a potential multiepitope peptide vaccine candidate to prevent FMDV infection.

Keywords: Foot-and-mouth disease virus, epitope, heavy chain constant region of sheep IgG

口蹄疫 (Foot-and-Mouth Disease, FMD) 是由口蹄疫病毒 (Foot-and-Mouth Disease Virus, FMDV) 引起的一种急性、热性、高度接触性并可远距传播的动物疫病。FMDV 宿主广泛, 口蹄疫发生后由于造成动物生产能力下降, 发病地区畜产品上市和出口受限以及为扑灭和控制疫情所用的巨额开支常给地区和国家造成严重的经济损失。人们在与 FMD 长期的斗争过程中已经充分认识到, 应用疫苗进行免疫接种是预防、控制乃至消灭 FMD 的有效手段之一。常规的弱毒疫苗与灭活疫苗由于其良好的免疫原性和提供的较高保护力, 从而在过去和当前 FMD 防控中发挥了重大作用。但是这些传统疫苗都存在多种缺点, 如安全性不足、需要严格地冷链运输及给区别自然感染动物与免疫动物带来很大困难等。为克服传统疫苗的缺点, 利用基因工程技术研制生物安全、优质高效、价廉的新型疫苗已经迫在眉睫, 而且成为 FMDV 相关研究的一个热点领域, 也是以后疫苗发展的必然趋势^[1]。

本研究拟在克隆 Asia I 型 FMDV 结构蛋白 VP1 基因并对其序列进行测定和分析的基础上, 设计和化学合成 FMDV 抗原表位基因, 将其与绵羊免疫球蛋白 IgG 重链恒定区编码基因串联后在大肠杆菌中进行融合表达, 从而获得由羊免疫球蛋白 IgG 重链恒定区作为载体蛋白携带 FMDV 抗原表位的多肽抗原, 对该融合蛋白的生物学活性进行鉴定后, 检测其诱发豚鼠产生免疫应答的情况。以期为进一步研制羊的 FMDV 表位肽疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病毒、菌株及主要试剂

Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 由国家口蹄疫参考实验室保存, BHK-21 细胞、大肠杆菌 JM109、BL21 (DE3) 及原核表达载体 pPROEx HTb 由本室

保存, pGEM T-easy 克隆载体购自 Promega 公司。限制性核酸内切酶、RT-PCR 反应试剂盒 (TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0)、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker、低分子量蛋白质分子量标准 Marker、质粒提取试剂盒、DNA 片段纯化试剂盒均购自宝生物工程 (大连) 有限公司, RNA 提取试剂盒 (RNeasy Mini Kit(50)) 购自 Qiagen 公司, 蛋白纯化试剂盒购自 Novagen 公司。细胞培养用胎牛血清和 DMEM/High Glucose 培养基购自 Hyclone 公司, 兔抗绵羊 IgG 抗体及 DAB 显色试剂购自博士德生物工程有限公司, 其他试剂均购自 Sigma 公司。

1.2 羊 IgG 重链恒定区基因的克隆及 FMDV 抗原表位编码基因的合成

按照 Qiagen 公司 RNA 提取试剂盒 RNeasy Mini Kit(50) 使用说明从绵羊脾脏组织提取总 mRNA 后, 进行 RT-PCR 反应。首先按照 TaKaRa RNA PCR Kit(AMV) Ver.3.0 使用说明在 PCR 管中组成反应体系和设置反应条件进行反转录反应, 然后以反转录得到的 cDNA 为模板, 用特异性引物: shIgG(C)-upper:5'-CTGCCTCAACAACACCCCCGAAA-3'; shIgG(C)-lower:5'-ATTTACCCGGAGGCTTAGAGATCGAC-3'进行 PCR 扩增目的基因。PCR 反应条件为: 94℃ 5 min 进行预变性; 然后 94℃ 1 min, 58℃ 40 s, 72℃ 1.5 min, 30 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。通过 RT-PCR 扩增得到目的基因并将其重组于 pGEM T-easy 克隆载体, 对所得重组体进行酶切和 PCR 鉴定, 阳性质粒命名为 pGEM-shIgG(C), 送上海生物工程公司进行测序鉴定。

用与上述基本相同的方法, 从 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 细胞适应病毒中提取病毒基因组 RNA, 应用引物 VP31:5'-CACAAATGTACAGGGATGGGT-3'和 NK61:5'-GACATGTCCTCCTGCATCTG-3', 在 56℃ 退火条件下, 通过 RT-PCR 扩增得到 FMDV VP1 基因并将其重组于 pGEM T-easy 克隆载

体,对所得重组体进行酶切和 PCR 鉴定,阳性质粒命名为 pGEM-VP1(JS),送上海生物工程公司进行测序鉴定。对测定结果进行全面分析后,选择病毒主要抗原表位基因所在区段设计出 Asia I FMDV 抗原表位编码基因并送往大连宝生物工程有限公司进行人工合成。表位基因重组于 pMD19-T simple 载体,并命名为 pMD-F。

1.3 重组表达质粒的构建

以质粒 pGEM-shIgG(C) 为模板,应用引物 P1-*EcoR* I:5'-GGGAATTCGCTCAACAACACCCCGAAA-3'和 P2-*Xho* I:5'-GGGCTCGAGTTTACCCGAGGCTTAGAGATCGAC-3'通过 PCR 扩增羊 IgG 重链恒定区基因,PCR 产物经 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切后,与经同样酶切过的 pPROEx HTb 载体相连接,构建成羊 IgG 重链恒定区基因的表达重组质粒 pPRO-shIgG。对构建正确的 pPRO-shIgG 应用 *Bam*H I 和 *EcoR* I 进一步双酶切,然后与从 pMD-F 质粒上应用同样酶切得到的表位基因片段相连接,从而构建得到融合表达 FMDV 抗原表位和羊 IgG 重链恒定区的重组质粒 pPRO-FshIgG (图 1)。

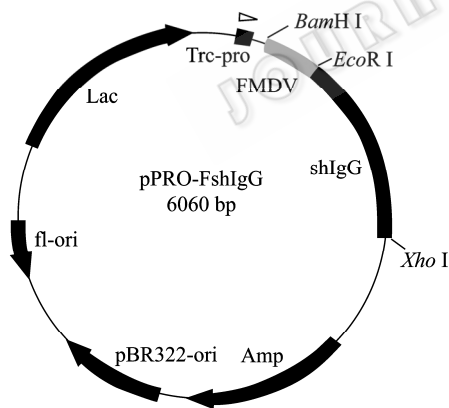


图 1 表达质粒 pPRO-FshIgG 的构建

Fig. 1 Construction of expression plasmid pPRO-FshIgG.

1.4 蛋白的表达、纯化及鉴定

将鉴定为阳性并且测序确定正确的 pPRO-shIgG 和 pPRO-FshIgG 重组表达质粒转化到大肠杆菌 BL21(DE3) 感受态细胞,挑取单克隆并增菌后,将阳性菌在添加氨苄青霉素的 LB 液体培养基中培养过夜,然后按 1% 转接到含 0.06 mg/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基中,37℃ 培养至对数生长期(OD_{600} =

0.6),加入终浓度 1 mmol/L 的 IPTG,37℃ 振荡培养,取各时间段 (2 h、3 h、4 h) 的表达产物各 1 mL 进行 SDS-PAGE 分析。

在鉴定重组菌能够正确高效表达后,将其进行大量培养并诱导表达蛋白。对表达的蛋白应用镍离子亲和层析技术进行纯化,对纯化产物进行 SDS-PAGE 分析。由 pPRO-shIgG 和 pPRO-FshIgG 表达的蛋白分别命名为 shIgG 和 FshIgG。然后应用兔抗山羊 IgG 抗体及 FMDV 标准阳性血清进行 Western blotting 对 shIgG 和 FshIgG 进行鉴定。

1.5 抗原制备与动物免疫

对上述纯化的蛋白进行浓度测定后,用蛋白溶解液调整蛋白浓度为 200 μ g/mL。按 1:1 的体积比加入蛋白液和 206 油佐剂后用玻璃注射器反复抽吸使之完全乳化而制成免疫抗原,这样每毫升疫苗中最终含有 100 μ g 蛋白。

将体重在 250~300 g 的 24 只豚鼠随机分成 4 组 (6 只/组),第一组每只豚鼠于后肢内侧肌肉注射 shIgG 制备抗原 1 mL;第二组豚鼠注射 FshIgG 制备的抗原 1 mL;第三组豚鼠按推荐剂量注射商品化 Asia I FMDV 灭活疫苗 (购自中国农业科学院中农威特公司) 1 mL 作为阳性对照;第四组豚鼠注射等量 PBS 作为阴性对照。第 1 次免疫后 28 d 对各组动物进行第 2 次免疫。所有豚鼠于无 FMDV 的隔离环境中饲养。

1.6 血清抗体动态监测和中和抗体效价测定

在免疫前、免疫后 7 d、14 d、21 d、28 d、35 d、42 d 对豚鼠进行心脏采血,分离血清用于抗体测定。将 Asia I 型 FMDV 灭活抗原用 ELISA 包被液进行 1/8 稀释后包被 ELISA 反应板后,按文献报道的方法应用间接 ELISA 方法测定血清中抗 FMDV 抗体^[2]。

在 96 孔细胞培养板上测定并用 Karber 法计算 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 对 BHK-21 细胞的半数组织感染量 ($TCID_{50}/100 \mu$ L)^[3]。通过微量中和试验对动物免疫前、免疫后 28 d 和免疫后 42 d 采集血清中的中和抗体效价进行检测。将待检血清 56℃ 灭活 30 min 后,用 DMEM/High Glucose 培养基在 96 孔细胞培养板中按 50 μ L 进行 2 倍系列稀释,每个稀

释度重复 4 孔, 然后每孔中加入 50 μL 含有 200 TCID₅₀/100 μL 的病毒液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱中作用 1 h 后每孔加入 50 μL 浓度为 1×10^5 个/mL 的 BHK-21 细胞悬液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。48 h 后在镜下作初步判断, 72 h 用 4% 多聚甲醛固定 30 min, 用 10% 福尔马林溶液配制的 0.05% 亚甲基蓝染液染色 30 min 后用水冲洗, 未病变细胞孔呈蓝色, 发生病变而细胞脱落者不着色。试验时设立阳性和阴性血清对照、病毒回归试验对照、血清毒性对照和正常细胞对照。按照 Karber 法计算出能保护 50% 细胞孔不产生细胞病变的最高血清稀释度, 该稀释度即为该份血清的中和抗体效价。

1.7 动物保护性试验

首先测定 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 豚鼠适应病毒的 ID₅₀。取在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 、含有 50% 甘油 PBS 缓冲液中保存的含病毒豚鼠脚皮 0.1 g 置于研钵中, 加石英砂研磨, 用 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 制成 1:10 (W/V) 的悬液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 浸毒过夜。然后 2000 r/min 离心 10 min 取上清, 用 PBS (pH 7.4) 进行 10 倍系列稀释, 将 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 稀释度的病毒液 0.2 mL 于豚鼠左后跖部皮内及皮下接种, 每个稀释度接种 300~350 g 豚鼠 4 只。每 24 h 观察记录发病情况, 至 72 h 最终判定并计算半数感染量 (ID₅₀)^[2]。

试验豚鼠在第 2 次免疫后第 14 天用上述测知 ID₅₀ 的 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 豚鼠适应病毒进行攻毒。各组的 6 只豚鼠左后跖部皮内和皮下接种 200 倍 ID₅₀ 剂量的病毒液。连续观察 72 h, 判定豚鼠发病情况。

2 结果

2.1 羊 IgG 重链恒定区基因的克隆

应用 RT-PCR 技术, 以从绵羊脾脏中提取的总 mRNA 为模板扩增到了预期大小的目的 DNA 片段, 在电泳图谱中可见一约 1000 bp 左右的特异性条带 (图 2)。将上述扩增到的 DNA 片段与克隆载体 pGEM T-easy 重组后, 对所得重组体应用 *EcoR* I 酶切消化鉴定。酶切图谱与预期一致, 从重组体上切下了特异的目的基因片段。对酶切鉴定阳性的重组体 pGEM-shIgG(C) 进行序列测定, 测序结果表明, 克

隆到的基因大小为 993 bp, 将其与 GenBank 中已提交的羊 IgG 重链恒定区基因序列 (GenBank Accession No. X69797.1) 进行比较发现, 克隆到的羊 IgG 重链恒定区基因序列与该序列的相似性高达 99% 以上。以上基本说明所克隆羊 IgG 重链恒定区基因序列的正确性。

以 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 细胞适应病毒中提取的病毒基因组 RNA 为模板, 应用引物 VP31 和 NK61 扩增得到一约 800 bp 的 DNA 片段。该 DNA 重组于 pGEM T-easy 克隆载体后, 对用酶切和 PCR 方法鉴定为阳性质粒命名为 pGEM-VP1(JS) 送上海生物工程公司进行测序鉴定。结果表明, 所克隆到的基因完整涵盖了 FMDV 结构蛋白 VP1 基因片段, 将其与国家口蹄疫参考实验室已公布的该毒株的基因序列 (GenBank Accession No. EF149009.1) 比较发现, 两者的相似性为 100%。

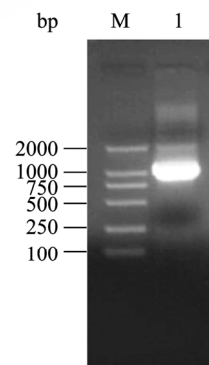


图 2 羊 IgG 重链恒定区基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR product of sheep IgG heavy chain constant region gene. M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of sheep IgG heavy chain constant region gene.

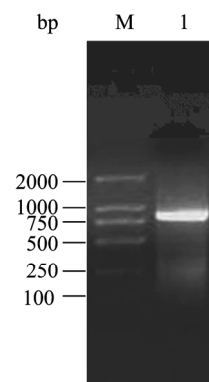


图 3 FMDV VP1 基因的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR product of FMDV VP1 gene. M: DNA marker DL2000; 1: PCR product of FMDV VP1 gene.

2.2 FMDV 抗原表位基因的设计、化学合成

根据上述所克隆并测定的 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 株 FMDV VP1 基因序列, 选择 VP1 的 136~160aa 及 198~211aa 位氨基酸肽段, 将其应用-GSSSGG-这一短肽连接组成 136~160aa-GGSSSGG-198~211aa-GGSSSGG-136~160aa-GGSSSGG-198~

211aa 重复串联形式 (图 4)。对该重复串联肽段的编码基因进行人工化学合成, 在其基因的 5'端和 3'端分别依次引入 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切位点, 并将其与 pMD19-T simple 载体重组, 重组体命名为 pMD-F。该表位肽编码基因大小为 288 bp, 共编码 96 个氨基酸。



图 4 Asia I 型 FMDV 抗原表位的设计

Fig. 4 Epitope design of type Asia I FMDV.

2.3 蛋白表达、纯化和鉴定

应用 SDS-PAGE 检测转化 pPRO-shIgG 和 pPRO-FshIgG 的重组大肠杆菌表达蛋白的情况。电泳图谱显示, 重组菌在 1 mmol/L 的 IPTG 诱导下分别高效表达了一个 40 kDa 左右和 45 kDa 的蛋白, 大小与预期目的蛋白大小相符。表达的蛋白应用镍离子亲和层析技术进行了纯化, 纯化蛋白的纯度可达 80% 以上 (图 5)。最后对纯化的蛋白应用 Western blotting 技术进行鉴定, 结果发现纯化所得的 shIgG 蛋白能够和标准兔抗绵羊 IgG 抗体呈强阳性反应, 而 FshIgG 蛋白则同时能够与兔抗绵羊 IgG 抗体和豚鼠抗 FMDV 的标准阳性血清反应 (图 6)。

2.4 血清抗体的测定

将所表达的蛋白 shIgG 和 FshIgG 乳化制备成疫苗以后免疫豚鼠, 应用间接 ELISA 方法测定血清抗体。结果表明, FshIgG 蛋白制成的疫苗免疫的豚鼠在免疫后 7 d 就可以检测到特异性抗体, 在后续的实验过程中, 该组动物的抗体水平一直呈持续增高的趋势。二免后抗体水平有所提高。商品化的灭活疫苗免疫动物在免疫以后则迅速产生抗 FMDV 的特异性抗体, 免疫 21 d 后就能达到很高的抗体水平, 第二次免疫对该组豚鼠抗体水平未见显著影响。作为阴性对照的应用 shIgG 蛋白和 PBS 免疫的豚鼠, 在整个实验过程中始终检测不到特异性抗体 (图 7)。

2.5 血清中和抗体效价的测定

用病毒微量中和试验对各实验组豚鼠在免疫前 (0 d)、二免前 (28 d) 及攻毒前 (42 d) 所采集血清中 FMDV 的中和抗体效价进行测定。结果显示,

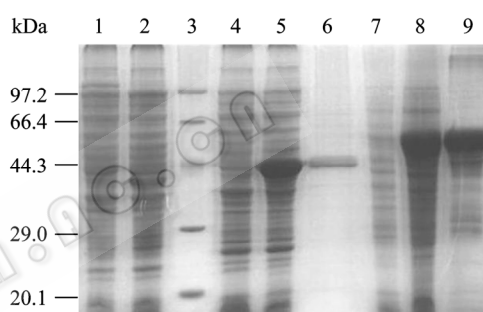


图 5 表达蛋白的 SDS-PAGE 检测

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of the expressed protein. 1: induced BL21(DE3) control; 2: induced pPROEx HTb/BL21(DE3) control; 3: protein marker; 4: uninduced pPRO-shIgG/BL21(DE3) control; 5: induced product of pPRO-shIgG/BL21(DE3); 6: purified product of shIgG; 7: uninduced pPRO-FshIgG/BL21(DE3) control; 8: induced product of pPRO-FshIgG/BL21(DE3); 9: purified product of FshIgG.

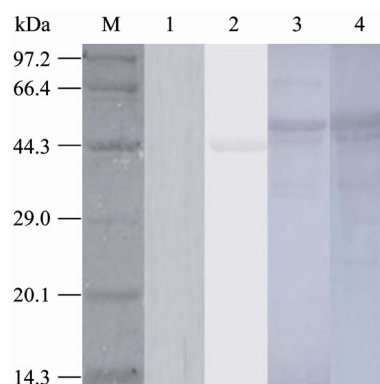


图 6 shIgG 和 FshIgG 的 Western blotting 分析

Fig. 6 Western blotting analysis of shIgG and FshIgG protein. 1: shIgG reacted with guinea pig anti-FMDV antibody; 2: shIgG reacted with rabbit anti-sheep IgG antibody; 3: FshIgG reacted with guinea pig anti-FMDV antibody; 4: FshIgG reacted with rabbit anti-sheep IgG antibody.

FshIgG 蛋白免疫豚鼠的血清中能够检测到较高效价的中和抗体。特别是在二免后两周进行攻毒时,其中和抗体效价基本达到了灭活疫苗免疫组动物的抗体水平(图 8)。

2.6 豚鼠攻毒试验

不同稀释度的适应豚鼠的 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV 液 0.2 mL 接种豚鼠后,豚鼠的发病情况表明(表 1),该病毒的 ID₅₀ 应在 10⁻⁵ 和 10⁻⁶ 之间,按 Karber 法计算其准确的 ID₅₀: lgID₅₀=L-d(s-0.5),其中, L=最高稀释度的对数; d=稀释度对数之差; s=发病率之和^[3]。那么,该病毒的 ID₅₀/0.2 mL 为 10^{-5.5}。

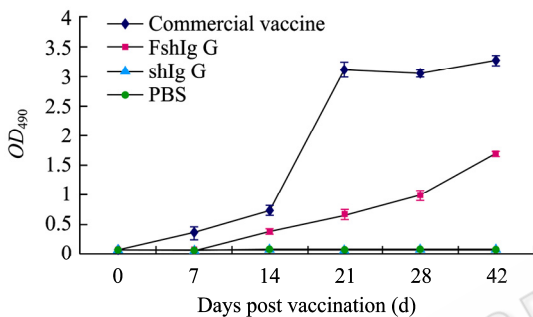


图 7 免疫豚鼠的抗体水平检测
Fig. 7 Antibody level of guinea pigs post vaccination.

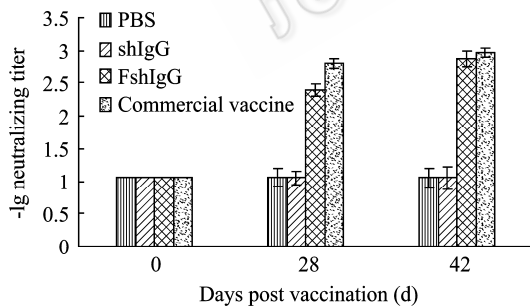


图 8 免疫豚鼠的中和抗体效价检测
Fig. 8 Neutralizing antibody titres of guinea pigs.

表 1 Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV ID₅₀ 的测定
Table 1 Identification of ID₅₀ for Asia I Jiangsu/China/2005 FMDV

Dilution of viral solution	Morbidity of inoculated animals
10 ⁻³	4/4=1
10 ⁻⁴	4/4=1
10 ⁻⁵	3/4=0.75
10 ⁻⁶	1/4=0.25
10 ⁻⁷	0/4=0

用上述测定 ID₅₀ 的 Asia I 型 FMDV 对所有免疫豚鼠进行攻击,结果发现用 FshIgG 免疫的 6 只豚鼠与用商品化灭活疫苗免疫豚鼠一样,所有豚鼠都未发病,而作为对照组的用 PBS 和用 shIgG 免疫的豚鼠则全部发病(表 2)。表明 FshIgG 蛋白免疫豚鼠后能够给豚鼠提供一定的保护力,使得动物能够抵御 FMDV 感染。

表 2 免疫豚鼠抗病毒能力检测
Table 2 Protection of immunized guinea pigs from viral challenge

Groups	Number of animals	Number of protection	Protection rate (%)
PBS	6	0	0
Inactive vaccine	6	6	100
shIgG	6	0	0
FshIgG	6	6	100

3 讨论

口蹄疫表位疫苗的研究起步很早,早在 1981 年, Kleid 等首次在大肠杆菌中成功表达 FMDV A12 株 VP1 重组蛋白抗原,并进行了免疫原性的研究分析,结果显示,重组蛋白抗原能够诱导机体产生中和抗体,免疫动物能够抵御同源病毒的攻击,说明 VP1 蛋白是 FMDV 重要的保护性抗原,这为口蹄疫表位疫苗的研制提供了依据^[4]。1982 年, Bittle 等首次报道了用化学合成的 FMDV VP1 结构蛋白 C 端 141~160aa 短肽,免疫动物后能够诱导机体产生中和抗体,并能抵御同源 FMDV 的攻击^[5]。这一成果成为口蹄疫乃至整个动物疫病表位肽疫苗研究的开端。

过去的大量研究已经表明, O 型 FMDV 结构蛋白 VP1 上 141~160aa 和 200~213aa 是病毒的两个优势中和表位,很多研究都在应用这两个抗原表位进行 O 型 FMDV 表位疫苗的研究,并取得了很好的免疫效果^[6-8]。因此,本实验选择了 Asia I 型 FMDV 结构蛋白 VP1 上与 O 型 FMDV 结构蛋白 VP1 上 141~160aa 位和 200~213aa 相对应的肽段 136~160aa 和 198~211aa 作为抗原表位,将其进行了重复串联后对其基因进行了人工合成。

但是,仅由抗原表位组成的 FMDV 表位疫苗并

不能给动物提供完全保护。究其原因,人们普遍认为由于表位多肽分子量小,易被细胞内的蛋白酶降解,不能够作为良好的免疫原刺激机体产生有效的免疫应答反应,所以为克服表位肽单独存在时免疫原性低的现象,人们常将表位肽与某些蛋白分子偶联来增强其免疫原性。这些蛋白分子常被称为表位载体分子,它们对于免疫动物可以是外源性的,也可以是宿主自身的某些蛋白分子。作为表位载体蛋白的外源性蛋白主要有 BSA^[9]、 β -半乳糖苷酶(β -galactosidase)^[10-11]、霍乱毒素、谷胱甘肽 S 转移酶(GST)和匙孔血蓝蛋白^[12]等。这些外源载体蛋白能够增强表位抗原的免疫原性,延长小分子表位抗原在机体内的降解半衰期。但载体蛋白对机体来说是一种外源抗原,机体会产生针对载体分子的免疫应答反应,可能在一定程度上分散了机体针对疫苗表位的免疫应答能力,从而导致疫苗免疫效果不够理想。国内外学者利用机体免疫系统不对自身物质发生免疫应答这一特点,将口蹄疫病毒 VP1 蛋白上的若干表位基因串联后与猪免疫球蛋白 IgG 重链恒定区基因融合,并在大肠杆菌中成功表达了融合蛋白。利用该蛋白免疫猪后的动物保护性试验显示,多表位重组蛋白疫苗具有较强的免疫原性,其不仅能刺激机体产生高效价的中和抗体,也能有效地诱导机体发生细胞免疫应答,而且免疫猪能够抵御 50~100 ID₅₀ 剂量的同源毒攻击,获得 100% 保护^[13-14]。这在一定程度上显示了动物自身 IgG 重链恒定区蛋白作为表位载体蛋白的优越性。

该研究中将上述所设计的表位与绵羊 IgG 重链恒定区基因串联后在大肠杆菌中得到了成功表达,得到了 Asia I 型 FMDV 抗原表位偶联于绵羊 IgG 重链恒定区蛋白 N 端所形成的融合蛋白 FshIgG。将 100 μ g FshIgG 融合蛋白与 206 油佐剂混合乳化后免疫豚鼠,在免疫后 2 周应用间接 ELISA 方法检测到了针对 FMDV 的特异性抗体。在二免以后 2 周,用 200 倍 ID₅₀ 的病毒剂量对免疫豚鼠进行攻毒试验,结果发现 FshIgG 免疫组的豚鼠全部得到了保护。这些结果充分地说明 FshIgG 蛋白具有良好的抗原性,该蛋白不但能够与标准的 FMDV 阳性血清特异性反

应,而且能够在动物机体内诱导产生针对 FMDV 的特异性的抗体。虽然从 FshIgG 免疫组豚鼠血清中 FMDV 抗体的检测结果来看,抗体水平达不到传统灭活疫苗所诱导的抗体水平,但是却能够提供与灭活疫苗相同的免疫保护。这可能与各自所诱导产生抗体的中和性和亲和力有关系。所以通过病毒微量中和试验对疫苗诱导产生的中和抗体水平进行了测定。结果表明,FshIgG 蛋白疫苗 2 次免疫动物以后,动物血清中的中和抗体效价可达 $10^{-2.8}$,基本与灭活疫苗免疫组豚鼠血清中和抗体水平一致。此外,本实验中之所以应用绵羊 IgG 重链恒定区蛋白作为抗原表位的载体,构建能够应用于绵羊的 FMDV 表位疫苗的候选抗原,是因为绵羊在感染 FMDV 后的发病率相对较低、临床症状不明显,易被忽略,从而携带病毒成为长期的传染源,其素有病原的“贮存器”之说。所以通过疫苗免疫提高羊群整体的 FMDV 免疫水平显得尤为重要。虽然以绵羊 IgG 重链恒定区蛋白作为抗原表位的载体的优越性和该抗原在绵羊的免疫效果还需进一步的试验来评价,但本实验的完成为进一步研制绵羊的 FMDV 表位疫苗奠定了一定的基础。

REFERENCES

- [1] Grubman MJ, Baxt B. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev*, 2004, **17**: 465-493.
- [2] Li J. Expression and processing of foot-and-mouth disease virus empty capsid proteins and the assessment of its immunogenicity. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.
李炯. 口蹄疫病毒空衣壳蛋白的表达加工及其免疫原性研究. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [3] Yin Z, Liu JH. *Animal Virology*. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997: 323-354.
殷震, 刘景华. 动物病毒学. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 323-354.
- [4] Kleid DG, Yansura D, Small B, et al. Cloned viral protein vaccine for foot-and-mouth disease: responses in cattle and swine. *Science*, 1981, **214**(4525): 1125-1129.
- [5] Bittle JL, Houghten RA, Alexander H, et al. Protection against foot-and-mouth disease by immunization with chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence. *Nature*, 1982, **198**: 30-33.

- [6] Francis MJ, Fry CM, Rowlands DJ, *et al.* Immunological priming with synthetic peptides of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol*, 1985, **66**(11): 2347–2354.
- [7] Broekhuijsen MP, Van Rijn JM, Blom AJ, *et al.* Fusion proteins with multiple copies of the major antigenic determinant of foot-and-mouth disease virus protect both of the natural host and laboratory animals. *J Gen Virol*, 1987, **68**(12): 3137–3143.
- [8] Morgan DO, Moore DM. Protection of cattle and swine against foot-and-mouth disease, using biosynthetic peptide vaccines. *Am J Vet Res*, 1990, **51**(1): 40–45.
- [9] Zamorano P, Wigdorovitz A, Perez-fil Gueira M, *et al.* A 10-amino-acid linear sequence of VP1 of foot-and-mouth disease virus containing B-and-T-cell epitopes induces protection in mice. *Virology*, 1995, **212**(2): 614–621.
- [10] Broekhuijsen MP, Blom T, Kottenhagen M, *et al.* Synthesis of fusion protein containing antigenic determinants of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine*, 1986, **4**: 119–124.
- [11] Winther MD, Allen G, Bomford RH, *et al.* Bacterially expressed antigenic peptide from foot-and-mouth disease virus capsid elicits variable immunologic responses in animals. *J Immunol*, 1986, **136**: 1835–1840.
- [12] Shieh JJ, Liang CM, Chen CY, *et al.* Enhancement of the immunity to foot-and-mouth disease virus by DNA priming and protein boosting immunization. *Vaccine*, 2001, **19**: 4002–4010.
- [13] Chan EW, Wong HT, Cheng SC, *et al.* An immunoglobulin G based chimeric protein induced foot-and-mouth disease specific immune response in swine. *Vaccine*, 2000, **19**(4/5): 538–546.
- [14] Li G, Chen W, Yan W, *et al.* Comparison of immune responses against foot-and-mouth disease virus induced by fusion proteins using the swine IgG heavy chain constant region or beta-galactosidase as a carrier of immunogenic epitopes. *Virology*, 2004, **328**(2): 274–281.

快 讯

武汉病毒所在《Nature Cell Biology》上报道 microRNA 与病毒复制的机制

来自德州大学健康科学中心、武汉病毒所肿瘤病毒研究组、北京中国科学院研究生院、韩国 Konkuk 大学生物技术系的科学家们在最新一期的《Nature Cell Biology》上发表研究成果文章。文章通讯作者是来自德州大学健康科学中心的 Shou-Jiang Gao 教授，他同时在武汉病毒研究所病毒学国家重点实验室任职。Gao 是 Greehey 儿童癌症研究所肿瘤病毒项目组组长，在过去的 10 年里，Gao 主要从事卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) 课题的研究。

卡波氏肉瘤相关疱疹病毒(KSHV) 又称人疱疹病毒 8 型 (HHV-8)，它是一种新的人类肿瘤病毒，是 1994 年美国学者 Chang 等首先从 AIDS 患者卡波氏肉瘤(KS) 组织中发现的一种新的肿瘤病毒，目前被认为是 KS 的致病因子。KS 是 AIDS 患者最易患的一种血管瘤，在 AIDS 患者中的发病率可高达 50%。

据研究发现，KSHV 在感染人类的潜伏期内，病毒的裂解性复制是维持病毒活性的关键机制，一旦经过这一时期，KSHV 就可以侵入宿主的免疫系统，并诱导肿瘤发生。

在本研究中，Gao 等发现，用遗传学手段改造卡波氏肉瘤相关疱疹病毒基因组，将基因组上的 14microRNA 簇删除后导致病毒裂解性复制活动增强，这一过程通过抑制 NF- κ B 活性来实现。

进一步对这个 miRNA 簇功能进行深入研究发现，14microRNA 簇通过抑制 I κ B α 蛋白的表达活性达到抑制 NF- κ B 通路的作用。通过计算机和 miRNA 种子诱变分析发现，卡波氏肉瘤相关疱疹病毒的 miR-K1 具有直接调控 I κ B α 蛋白表达的功能。重新表达 miR-K1 可重新激活 NF- κ B 信号，并抑制病毒裂解复制活性。相反，如果抑制 miR-K1 的功能，则取得相反的结果。

这些结果表明，卡波氏肉瘤相关疱疹病毒编码一种 microRNA 经 NF- κ B 来控制病毒复制过程。这些结果表明，在卡波氏肉瘤相关疱疹病毒复制过程中，miRNA 具有重要的调节作用。

来源: 生物通